评述

荧光碳点的生物效应及其应用研究进展

胡旭虎^{①②}, 张相春^②, 赵喆^③, 郭娟娟^②, 王强^{①*}, 刘茹^{②*}

① 中南民族大学药学院, 武汉 430074

② 纳米生物效应与安全性重点实验室; 中国科学院高能物理研究所, 北京 100049

③ 武警总医院现代化医院管理研究所, 北京 100039

*通讯作者, E-mail: wq@mail.scuec.edu.cn; liuru@ihep.ac.cn

收稿日期: 2015-08-25; 接受日期: 2015-12-07; 网络版发表日期: 2016-05-23

国家重大科学研究计划(2013CB932703, 2013CB932701)、国家自然科学基金(21102185, 31200751, 31271072, 31300805)和发改办高技[2013]2140 号资助项目

摘要 作为碳纳米材料的新成员, 荧光碳点自发现以来以其独特的光学性能和生物效应引起了人们广泛的关注. 新型荧光碳点表面经过钝化修饰后, 被赋予相关的反应活性及靶向选择性. 此外, 荧光碳点更具有较低细胞毒性及优异的生物相容性, 使碳点的应用日益多样化, 特别在生物医学领域具有广阔的应用前景. 本文对荧光碳点在生化分析、微生物检测、生物成像及疾病诊断治疗上的应用研究进展做了详细的论述.

关键词 荧光碳点, 生物效应, 生化分析, 生物成像, 诊断治疗

1 引言

荧光碳纳米粒子最早由 Xu 等^[1]意外发现, 2006 年 Sun 等^[2]制备并获得了直径小于 10 nm 且具有荧光性能的碳纳米粒, 并将其命名为碳点(carbon dots, C-Dots). 碳点具有制备简单、造价低廉、荧光性能稳定、荧光寿命长、抗光漂白性强等优点. 经钝化修饰后, 可赋予碳点一些特殊性能, 如与其他有机物、无机物、高聚物及生物分子发生相互作用的能力. 此外, 荧光碳点还表现出优异的生物相容性, 可制备成生物探针, 在生物传感^[3]、生化分析、生物成像^[4]和疾病治疗等生物医学领域也有着重大的应用前景. 本文主要针对荧光碳点的生物特性及其在该领域的应用进行综述, 希望为今后对碳点的研究提

供参考.

2 荧光碳点的光学特性及其生物效应研究

目前, 随着对碳点认识的不断深入, 人们发现制备荧光碳点所用原料、制备方法及钝化修饰所用试剂的不同都能得到性能各异的碳点, 导致碳点应用的多样性. 因此, 将碳点表现出的特殊性质进行总结和论述, 具有重要的意义.

2.1 光学特性

以碳元素为基础的纳米材料中, 发射光谱常存在激发光依赖性和尺寸依赖性^[5-11], 该性质为检测生物样品选择合适的发射光谱提供了可能. Sun 等^[2]最

引用格式: 胡旭虎, 张相春, 赵喆, 郭娟娟, 王强, 刘茹. 荧光碳点的生物效应及其应用研究进展. 中国科学: 化学, 2016, 46: 665-676
Hu XH, Zhang XC, Zhao Z, Guo JJ, Wang Q, Liu R. The biological effects and environmental application of fluorescent carbon dots. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 665-676, doi: 10.1360/N032015-00183

早发现, 碳点存在多光子激发现象. 进一步研究发现, 碳点具有上转换荧光发射的性能.

具有上转换荧光性能的碳点使用可见光或红外光作为激发光源, 不但对活体细胞和组织的光损伤小, 还可以很大程度上减弱活体样品检测中的光毒性, 而且穿透能力更强, 可以用于检测更厚的样品, 解决对生物组织中深层物质的层析成像问题. 这些优势在生命科学领域具有很高的应用价值.

此外, 荧光碳点钝化修饰的表面富含电子, 在电子传递过程中可产生化学发光(chemiluminescence, CL). 一些经典的具有较高化学荧光强度的试剂如发光胺、光泽精、过氧草酸盐、高锰酸钾及二氢卟吩e6 (Ce6)虽然也被广泛用于化学荧光分析法^[12,13], 但是这些试剂大多具有毒性较高、价格较贵、选择性差及线性范围窄的缺陷, 很大程度上限制了化学荧光分析法的应用. 因此, 碳点优良的电子传递性能及光学性质为化学荧光分析法提供了重要的新材料. Xue等^[14]以柠檬酸为原料, 用 PEG_{1500N} 钝化剂制备得到的荧光碳点与 H₂O₂ 和 NaHSO₃ 溶液共同组成 CL 系统, 在该碳点的作用下 H₂O₂-HSO₃⁻的化学荧光强度增大了 60 倍. 研究表明, 碳点与 H₂O₂ 及 HSO₃⁻发生反应后生成的 CD^{•-}和 CD^{•+}发生电子转移湮没, 转变成激发态的 CD, 并由激发态的 CD 释放出来强烈荧光(图 1). H₂O₂-HSO₃⁻-CDs 系统为检测环境中的 H₂O₂ 提供了新的方法. 该系统制备简单、毒性低, 有望取代传统的化学荧光系统. 碳点具有的化学荧光性能, 拓展了碳点在环境化学、微生物学、生物化学等学科领域的应用范围.

图 1 H₂O₂-HSO₃⁻-CDs 系统化学荧光机理图^[14] (网络版彩图)

2.2 生物效应

荧光碳点所表现出的优异光学性质, 受到越来越多的研究者的重视. 他们不断地尝试将碳点优良的理化性质运用于生物检测中. 在此之前, 富勒烯、单壁纳米碳管和多壁纳米碳管等碳纳米材料已被广泛运用于生命科学领域^[15,16], 然而, 越来越多的研究表明它们都具有潜在的环境污染性和生物毒性^[17]. 因其溶解度低, 难以被生物降解, 可能会沿着食物链迁移和富集, 这些碳纳米材料现已被认为是一类新型的潜在污染物. 目前, 对荧光碳点生物毒性的研究工作尚处于起步阶段, 但是通过研究证实, 同样尺寸的纳米材料中, 碳点在生物体内的毒性最低^[18,19], 并且只有在远超过正常使用浓度时才会对细胞产生显著毒性. 另外, 碳点的毒性还可以通过修饰进行改善. 碳点所表现出的良好的生物相容性, 表明其对环境的危害较小, 拓宽了它在生命科学领域的应用范围.

在研究荧光碳点的细胞毒性时, Shen 等^[20]以聚乙烯亚胺(PEI)为原料, 制得亲水性荧光碳点. 用不同浓度的该荧光碳点溶液与 HeLa 细胞共培养, 用 MTT 实验来评价细胞活性, 发现当碳点浓度高达 1.1 mg/mL 时, 对 HeLa 细胞仍无明显的毒性. Han 等^[21]用蜡烛烟炱制备的碳点, 与 HeLa 细胞共培养后, 发现细胞代谢 MTT 的能力增强. 说明碳点对 HeLa 细胞代谢 MTT 具有明显的促进作用, 并且细胞存活率随碳点浓度的升高而增高. 进一步说明该碳点对 HeLa 细胞不但没有毒性作用, 反而能够促进 HeLa 细胞的生长代谢. Chandra 等^[22]将表面富含羧基的碳点作用于红细胞, 通过红细胞的溶血实验来评价其细胞毒性. 发现当 C-Dots 的浓度达到 330 μg/mL 时, 才表现出明显的毒性. 而当 C-Dots 表面的羧基转变成酰胺键时, 同等浓度下的碳点却对红细胞无明显毒性. 说明碳点功能化的表面对碳点的毒性也具有至关重要的作用.

Yang 等^[23]不仅研究了其制备的低聚 PEG 修饰的碳点的细胞毒性, 而且还检测了碳点对小鼠活体的影响. 对人乳腺癌细胞 MCF-7 和人结肠癌细胞 HT-29 的细胞毒性实验发现, 即使 C-Dots 的共培浓度达 200 μg/mL 也未对两种细胞的存活产生显著影响. 这与相同浓度的 PEG 包裹的 CdSe/CdS 量子点^[24]及 CdSe/ZnS 量子点^[25]相比细胞毒性更低. 他们还用该 C-Dots 对 CD-1 雄性小鼠进行了活体实验. 将小鼠

分成 3 组, 第一组按每天 8 mg/kg 量静脉注射 C-Dots, 第二组按每天 40 mg/kg 注射, 第三组每天注射 0.9 % NaCl 溶液. 在相同生存条件下连续观察 4 周, 所有小鼠均未出现死亡、厌食、脱毛、呕吐、腹泻等症状, 小鼠行为并无异常, 也未出现狂躁及抑郁状况. 三组小鼠体重增加量也未出现显著差别. 他们还检查了各组小鼠在第 1、7、28 d 的血清生化指标. 其中肝功能指标丙氨酸转氨酶 ALT 和天冬氨酸转氨酶 AST, 三组小鼠水平相近; 肾功能指标血尿酸量 UA、尿素量 BUN、肌酐量 Cr, 给药组与对照组相比也未发生明显变化(图 2). 高浓度给药组小鼠的肝、脾和肾脏还做了组织病理切片, 观察 C-Dots 是否对小鼠重要脏器有损伤作用. 结果显示, 给药组的器官结构均正常, 未发现有脂肪变性、组织坏死、水肿性病变等现象(图 3). 在小鼠体内进行长达 28 d 的实验, 对小鼠活体也不会产生显著影响, 这预示着 C-Dots 在正常实验用量时对小鼠的毒性极小, 远低于以 CdSe 为基础^[26]的量子点的毒性. Qu 等^[27]也用其制备的荧光

图 2 静脉注射量为 8 mg/kg 组(灰色)、40 mg/kg 组(白色)和 0.9% NaCl 组(黑色)分别在第 1 d (a)、7 d (b)、28 d (c) 的血清生化指标检测结果^[23]

图 3 小鼠对照组和在 1、7、28 d 供试后的肝、脾、肾脏组织病理切片图^[23] (网络版彩图)

碳点作用于小鼠, 来研究碳点的生物相容性. 用 0.7 mg/mL 的 C-Dots 水溶液连续喂养小鼠 5 周, 与对照组相比未出现死亡、厌食、脱毛、呕吐、腹泻等临床症状, 小鼠行为正常, 未现狂躁及抑郁状况. 给药期间能在小鼠的血液和尿液中检测到 C-Dots 的荧光信号, 而停药后用正常水溶液喂养小鼠 4 周后, 实验组尿液中不再检测到碳点荧光. 实验结果说明, C-Dots 在小鼠体内具有良好的生物相容性. 这也预示着 C-Dots 作为一种绿色材料, 在检测环境污染物, 以及用于细胞和活体的各种实验中具有重大的应用价值.

3 荧光碳点在生物医学中的应用

荧光碳点作为优良的新型荧光材料, 凭借其良好的光学性能和生物相容性, 以及碳点表面多种官能团的存在为其功能化修饰或载药提供了极大的可能. 碳点越来越多地运用于生化分析和生物成像上, 用于监测生物体内各物质的变化及对生物体疾病的诊断治疗. 因此, 在生物影像学和医学领域同样具有潜在的应用前景.

3.1 生物传感器

随着技术的不断进步, 利用纳米生物传感器检测糖类^[28,29]、蛋白质、DNA^[30,31]、活性因子等生物分子的方法不断被报道. 与这些纳米材料相比, 碳点所

具有独特荧光和电子传递性能, 以及制备简单、生物相容性好、灵敏度高、背景干扰小、成本低廉等特点^[32], 可用于检测生物体内各种生化物质成分的变化过程。

Shi 等^[33]发现, 其制备的碳点具有良好电子转运功能, 具有与过氧化物酶类似的催化活性. 在四甲基联苯胺(TMB)与过氧化氢的反应中具有比辣根过氧化物酶(HRP)更高的催化活性. 经优化后的 C-Dots 在催化 TMB 与 H_2O_2 反应中, 溶液颜色变化与 H_2O_2 浓度正相关, 可以用分光光度法检测溶液中 H_2O_2 的浓度, 检测限达 $0.2 \mu\text{mol/L}$. 当在该体系中加入葡萄糖氧化酶时, 可对溶液中葡萄糖含量进行检测, 检测限可达 $0.4 \mu\text{mol/L}$ (图 4). 因此可用该法检测环境中葡萄糖的含量, 并且其他单糖如果糖、乳糖、麦芽糖对检测结果的干扰较小. 说明该法对葡萄糖的检测具有较高的特异性。

甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是人体内癌症检测的一种重要的生物标志物. Dai 等^[34]利用碳点(CNDs)优异的电子传导性与阳离子交换剂全氟磺酸(Nafion)制成纳米复合膜覆盖于玻碳电极(GCE)表面制得新型 CNDs/Nafion/GCE 电极, 该电极对鲁米诺试剂的电化学催化能力极强. 再将甲胎蛋白的抗体(anti-AFP)通过静电作用吸附在电极表面, 当溶液中

图 4 (A) C-Dots 催化 TMB 与 H_2O_2 反应原理图; (B) TMB 在 pH 3.5 的 NaAc 缓冲溶液(0.2 M)中, 35°C 下不同反应体系在 655 nm 处的吸收值: (a) C-Dots+TMB, (b) TMB+ H_2O_2 , (c) TMB+C-Dots+ H_2O_2 ; (C, D) 运用图(B)中方法绘制的 H_2O_2 和葡萄糖的标准曲线图及不同浓度下溶液颜色变化^[33] (网络版彩图)

有 AFP 存在时, anti-AFP 与其特异性结合形成非导电性的免疫复合物, 从而导致鲁米诺试剂的电化学发光强度减弱, 可以间接用于对溶液中 AFP 的检测(图 5). 该法对 AFP 的检测限可达 0.1 pg/mL , 并且 anti-AFP/CNDs/Nafion/GCE 免疫传感体系经过清洗后可以重复使用. 该法也为其他蛋白分子的检测提供了新的思路。

Bai 等^[35]制备的 C-Dots 具有良好的供电子效应, 当亚甲蓝(MB)吸附于其表面时, 可通过电子转换作用使 C-Dots 的荧光发生猝灭. 而当溶液中有 ct-DNA 存在时, MB 会从 C-Dots 表面脱落, 特异性地与 DNA 结合, 而使 C-Dots 的发光能力恢复(图 6). 利用该原理, Bai 等用制备的 MB-C-Dots 体系检测溶液中游离的 ct-DNA. 研究显示, 该系统对 ct-DNA 的检测限达 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 并且浓度在 $3.0 \times 10^{-6} \sim 8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围时, CDs 的相对荧光度与 ct-DNA 的浓度具有较好的线性关系. 该法为开发检测生物体内核苷酸分子提供了新的方法。

Huang 等^[36]制得的碳点与纳米金(AuNPs)及壳聚糖(CS)制成复合膜吸附于玻碳电极(GCE)上制得复合电极(Au@CDs-CS/GCE). 该复合电极对多巴胺(DA)极其敏感, 可用于伏安法中检测 DA. 因 CDs 表面富

图 5 anti-AFP/CNDs/Nafion/GCE 复合体系用于 AFP 的检测原理图. 插图为 CNDs/Nafion 复合物 CNDs 的 TEM 图^[34] (网络版彩图)

图 6 C-Dots 检测 DNA 原理图^[35]

含羟基,不但可以稳定电极,而且可以通过静电吸引力,特异性识别DA中的氨基.而AuNPs则能增强电极表面的导电性.与未包覆复合膜的GCE相比,Au@CDs-CS/GCE对氧化DA具有更高的催化活性.并且Au@CDs-CS/GCE对溶液中的抗坏血酸(AA)及尿酸(UA)表现出很强的抗干扰能力.在最佳条件下,电流变化值与DA浓度(范围在0.01~100.0 μM)呈线性关系,且最低检测限为1 nM.因此,Au@CDs-CS/GCE电极为检测多巴胺提供了良好的分析平台.

Wei等^[37]以聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为原料,制备得到荧光碳点.发现碳点在 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}$ 溶液中的荧光强度明显减弱.基于此现象,他们将碳点制成荧光探针用于检测 H_2O_2 .优化条件后得到碳点荧光变化值与 H_2O_2 的浓度呈线性关系,检测限达0.1 μM .反应机理为 H_2O_2 与 Fe^{2+} 在溶液中发生了Fenton反应,生成了 $\text{OH}^\cdot$,从而影响了碳点的荧光强度.由同一机理,Wei等又将该碳点制成荧光探针用于检测在胆碱酯酶(ChOx)存在下溶液中胆碱Ch的含量,及在乙酰胆碱脂酶(AChE)的存在下检测乙酰胆碱ACh的含量.结果显示,Ch和ACh的检测限分别为0.1和0.5 μM ,线性范围为0.1~40和0.5~60 μM .此法同样适用于检测被相应的酶水解后产生 H_2O_2 的其他物质.反之,当底物浓度一定时此生物传感器也可以用于检测酶的活性.

Yang等^[38]将制备的荧光碳点并将其结合于具簇状 MnO_2 纳米颗粒上,由于荧光共振能量转移效应,使荧光能量从碳点转移至 MnO_2 上而发生荧光猝灭.当体系中谷胱甘肽(GHS)有存在时,使 MnO_2 转变为 Mn^{2+} ,能量转移被中断,猝灭的荧光复现.且CDs- MnO_2 体系对谷胱甘肽具有较高的灵敏度,检测限可达0.015 $\mu\text{mol/L}$.利用该荧光传感器可对溶液及活细胞细胞内谷胱甘肽水平进行定量检测(图7).

细胞内pH的调节对细胞行使其正常功能起到至关重要的作用,细胞内的各种生化反应也会引起胞内pH的变化.因此,有效检测细胞内pH的变化对监控细胞状态及细胞内的各种生化反应具有重要意义.大多经钝化修饰的碳点表面富含羟基和羧基,对溶液中的pH较为敏感.溶液pH的变化会导致碳点表面电荷发生变化,从而引起碳点的性质及碳点间距的变化,最终导致碳点荧光强度发生变化.Shen等^[20]以聚乙烯亚胺(PEI)为原料,制得亲水性荧光碳点对环境中pH变化具有很强的敏感性.在2~12的

图7 CDs- MnO_2 荧光传感器检测谷胱甘肽原理图^[38] (网络版彩图)

pH范围内,随着pH的升高,碳点的荧光强度逐渐减弱,并对pH刺激具有可逆性,即氢离子浓度反复变化下,相同pH下对应的荧光强度值始终保持不变.该碳点荧光强度对溶液中pH敏感的原因可能是随着溶液 OH^- 浓度的增大,阴离子使碳点表面的酰胺基发生分解,从而使碳点发生聚集荧光发生猝灭,荧光强度减弱.因此该荧光碳点具有优良质子传感器的特性,有望用于生物体内代谢过程中释放质子的监测.Du等^[39]将异硫氰基荧光素(FITC)修饰于碳点上得到具有荧光共振能量转移特性的复合荧光碳点.该荧光碳点对细胞中pH变化较为敏感,在活细胞的摄取过程中,可对整个纳米材料内吞作用中细胞pH的变化过程进行实时可视化监测.因此该生物传感器在研究内吞过程中细胞膜的相互作用、溶酶体的形成过程及亚细胞器内pH的调控中具有较大的应用价值.

3.2 对微生物的标记检测

微生物是生物医学研究的重要对象.了解病原微生物的生物学特性与致病性,认识人体对病原微生物的免疫作用及感染与免疫的相互关系,掌握传染病及与微生物有关的其他疾病的诊断方法、预防和治疗的基本原则,同样也是生物医学领域的主攻方向.现常运用核酸探针、聚合酶链式反应技术(PCR技术)、免疫学技术等生物技术检测病原微生物.核酸探针和PCR技术虽然灵敏度高、特异性强,但是需要借助比较昂贵的检测仪器,不方便进行现场检测.而利用荧光碳点检测微生物可弥补上述方法的不足,因此受到越来越多研究者的关注.利用碳点对微生物进行标记及检测的报道也逐年增多.

Mehta等^[40]将制备的具有激发光依赖性的荧光碳点作为荧光探针用于大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.*

coli)和酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的细胞标记,发现碳点主要分散于大肠杆菌的细胞膜和细胞质,未出现在核内.而在酵母菌中,碳点分散于整个细胞中,包括细胞核(图8和图9).实验表明,碳点对大肠杆菌和酵母菌显影效果良好并具有很好的生物相容性,可将这种多色荧光碳点广泛用于细菌的标记和监测.

Weng 等^[41]以柠檬酸胺和甘露糖为原料制备得到对大肠杆菌(*E. coli*)具有选择性吸附的荧光碳点.该碳点能与大肠杆菌菌毛上的黏附蛋白 FimH 特异性结合.吸附碳点的大肠杆菌在激发光照射下发射出

图8 C-Dots用于大肠杆菌的显色. 大肠杆菌在C-Dots培养下荧光共聚焦显微镜明场图像(a)和在激发波长为 405 nm (b)、488 nm (c)、561 nm (d)下的荧光明场叠加图; 大肠杆菌与C-Dots共培在荧光共聚焦显微镜激发波长为 405 nm (e)、488 nm (f)和 561 nm (g)的荧光显像^[40] (网络版彩图)

明亮荧光,可运用该原理对大肠杆菌进行定性定量检测(图10).该法对大肠杆菌的检测限达 450 CFU/mL,且浓度在 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ CFU/mL 时,吸附碳点荧光强度与浓度具有较好的线性关系,可对大肠杆菌进行定量检测.他们还利用该法成功对自来水、果酱及人尿液中大肠杆菌进行实时检测.该法具有成本低、操作简单快捷的优势,在快速筛选大肠杆菌上具有很高的潜在应用价值.由于碳点修饰的多样性,这也为针对不同菌种开发出特异的荧光碳

图9 C-Dots用于酵母菌的显色. 酵母菌在C-Dots培养荧光共聚焦显微镜下明场图像(a)和在激发波长为 405 nm (b)、488 nm (c)和 561 nm (d)下的荧光明场叠加图; 酵母菌与C-Dots共培在荧光共聚焦显微镜激发波长为 405 nm (e)、488 nm (f)和 561 nm (g)的荧光显像^[40] (网络版彩图)

图10 荧光碳点用于检测大肠杆菌. (a) 荧光碳点吸附于大肠杆菌表面黏附蛋白 FimH 图; (b) 利用荧光碳点检查大肠杆菌含量图^[41] (网络版彩图)

点探针进行定性定量检测提供了可能.

3.3 生物成像

基于其独特的光学性质, 碳点越来越多地被制成生物探针用于细胞显影. 其作为生物探针具有的独特优势在于具有较高的荧光量子产率, 抗光漂白性强, 并且较宽的吸收横切面可用于精确调节荧光发射.

Han 等^[21]制得的荧光碳点与 HeLa 细胞共孵育, 4 h 后在高倍镜下观察, HeLa 细胞在 488 nm 蓝光激发下呈现出明亮的荧光. 将固定细胞放置在 4℃ 冰箱中 24 h 后, 再观察发现细胞仍具有很强的荧光. 结果表明, C-Dots 具有很高的荧光稳定性, 可以用来对细胞进行较长时间的荧光标记. Wei 等^[42]将制得的具有良好水溶性的荧光碳点, 用于 L02 和 S180 细胞的显影, 发现制得的碳点具有良好的生物相容性和低毒性. MTT 实验表明, 即使碳点的浓度达到 0.64 mg/mL, 其对两种细胞也无明显毒性. 最近, Zhao 等^[43]以大蒜为原料制得表面富含氮、硫原子的荧光碳点, 该碳点不但有较高的光学和化学稳定性, 而且还具有清除自由基的能力. 这种碳点的发射光谱具有激发光依赖性, 可用不同波长激发光对 A549 细胞进行多色成像.

Jiang 等^[44]分别以苯二胺的 3 种同分异构体为原料制备得到 3 种不同的荧光碳点. 3 种碳点在紫外光 ($\lambda=365$ nm) 照射下分别发射出绿、蓝、红色荧光. 3 种荧光正好可组成 RGB 色彩模式, 预示着该碳点在制备全彩显示屏上有着巨大的应用前景(图 11). 该碳点所表现出的较低细胞毒性同样预示着在细胞内的多色成像上有着广阔的应用前景. 该课题组成功地将 3 种碳点运用于 MCF-7 细胞的显像(图 12). 该碳点所具有的上转换荧光性, 也可用于深层组织的双光子激发荧光成像.

近年来, 将碳点用于生物体内荧光显影的报道也较多^[43,44]. Qu 等^[27]在研究碳点生物相容性时, 将植物豆芽培养于碳点浓度为 1.5 mg/mL 的溶液中, 在豆芽体内可检测到激发光依赖型荧光(图 13), 说明碳点可以被植物细胞吸收, 并对豆芽的生长没有阻碍作用, 可用于植物体的显影.

Tan 等^[45]将经多聚赖氨酸(PLL)钝化修饰后的碳点, 加入到养有古比鱼的水中, 10 min 后在 455 nm 激发光照射下古比鱼腹部和头部观察到明亮的绿色荧

光, 说明碳点可透过鱼鳃部的毛细血管进入体内, 且具有良好的荧光稳定性(图 14).

图 11 (a) 苯二胺的 3 种同分异构体制备 3 种发射不同荧光的碳点; (b) 在紫外光($\lambda=365$ nm)照射下 3 种碳点的荧光图^[44] (网络版彩图)

图 12 激发光($\lambda=405$ nm)激发下 MCF-7 细胞荧光显像图. (a) 间苯二胺为原料制得的碳点; (b) 邻苯二胺为原料制得的碳点; (c) 对苯二胺为原料制得的碳点^[44] (网络版彩图)

图 13 培养于碳点溶液中的豆芽荧光成像图. (a~d) 分别为可见光、EX 340 nm/BA 395 nm、EX 420 nm/BA 450 nm、EX 500 nm/BA 550 nm 成像图^[27] (网络版彩图)

图 14 C-Dots 用于古比鱼的活体显像. (a) 用含 C-Dots 溶液培养的古比鱼与其对照组的图片; (b) 用 C-Dots 培养后的古比鱼、对照组和初始 C-Dots 培养液的明场图; (c) C-Dots 培养后的古比鱼、对照组和初始 C-Dots 培养液的荧光显像图; (d) C-Dots 培养液与其对照组培养液的荧光光谱图^[45] (网络版彩图)

Yang 等^[46]最先将荧光碳点当作荧光造影剂作用于活鼠. 通过皮下注射将碳点注入小鼠前肢, 在 470 nm 激发光持续照射下观察, 发现碳点缓慢迁移到腋下的前哨淋巴结部位. 24 h 后切割分离腋下淋巴结, 在样品中可以清晰观察到碳点的荧光. Yang 等还将碳点通过静脉注射注入小鼠体内观察其在体内的代谢. 注射 1 h 后在膀胱处可观察到明亮的荧光, 3 h 后在小鼠尿液中可检测到荧光, 说明碳点可通过尿液排出体外. 4 h 后, 切除小鼠的肝脏、脾和肾脏, 进行观察都发现极弱荧光, 肾脏中的荧光强度比肝脏中的强, 说明碳点可能主要是通过肾脏随尿液排出(图 15). 整个显影过程中碳点的荧光强度稳定, 在反复激发下未发生明显衰减. 碳点稳定的荧光性能, 及较低的细胞毒性和良好的生物相容性赋予其在生物成像及生物医学方面的巨大应用价值.

3.4 诊断治疗

碳点不但具有优良的荧光特性, 而且其经功能化修饰后的表面也可连接上药物用于靶向治疗. 因此利用碳点制作的运载系统用于显影和治疗的报道也在逐年增多. Hu 等^[47]以广泛用于基因转运的分支型聚乙烯亚胺(bPEI)为原料, 制备得到具有高荧光强度的碳点(PCDs). 经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 及傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)检测发现碳点表面存在大量的

图 15 C-Dots 用于小鼠体内成像静脉注射 C-Dots 后小鼠明场图(a)、检测荧光图(Bl 为膀胱, Ur 为肾脏) (b)、彩色图像(c). (a'~c', a''~c'') 切割下的肾脏(a'~c')和肝脏(a''~c'')的明场、荧光和彩色图像^[46] (网络版彩图)

分支型聚乙烯亚胺链. 该碳点发射光稳定且发射光谱无激发光依赖性. 因此, Hu 等将其与能表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的报告基因结合, 与 MCF-7 细胞共同培养, 转染细胞再培养 48 h 后, 在 405 和 488 nm 的激发光下, MCF-7 细胞内分别显示碳点的蓝光和 EGFP 的绿光(图 16). 由于 PCDs 特殊的结构和光学性质, 使 PCDs 具有良好的生物相容性和较低细胞毒性, 可以同时用于生物显影及基因的转运.

神经胶质瘤是一种常见并具有高致命性的人类脑部肿瘤. 对脑部神经胶质瘤细胞进行识别和精准定位对于该肿瘤的早期诊断和有效治疗具有重大意义. Zheng 等^[48]在研究以 *D*-葡萄糖和 *L*-天冬氨酸为原料制备的荧光碳点 CD-Asp 时发现, 该碳点对 C6 胶质瘤细胞具有较高的选择性. 将 CD-Asp 通过尾静脉注射入接种有 C6 胶质瘤的小鼠进行活体成像. 如图 17 所示, 该碳点很容易穿过血脑屏障扩散至脑组织, 5 min 后开始在脑组织聚集, 15 min 荧光强度达到峰值. 20 min 后在脑部的三维重构分布图中, 可发现 CD-Asp 在神经胶质瘤中的荧光强度明显高于其他正常脑组织. 90 min 后的体外活体成像图也说明 CD-Asp 对神经胶质细胞具有靶向作用. 该荧光碳点有望制成新型纳米医药载体, 用于神经胶质瘤的诊

图 16 (a, c) PCDs 用于 MCF-7 荧光显像激发光波长为 405 nm 时 MCF-7 细胞显蓝色荧光; (b, d) 激发光波长为 488 nm 时 MCF-7 细胞显绿色荧光^[47] (网络版彩图)

图 17 尾静脉注射 CD-Asp 后接种神经胶质瘤小鼠的体内和体外活体成像图。 (a) 注射 CD-Asp 后的全身时间分布图; (b) 20 min 时 CD-Asp 在脑部的三维重构成像图; (c) 90 min 时 CD-Asp 脑部体外活体成像图^[48] (网络版彩图)

断和治疗。

新发现的中空碳点(hollow luminescent carbon dots, HCD)具有较大的可供修饰的表面及优异的流动性。可用作药物载送系统^[49]、催化剂载体^[50]及吸附剂^[51]。经过不同修饰后不但可以用于生物显影, 还可以用于药物存储、药物控释^[52,53]、靶向治疗及癌细胞的发现和隔离^[54]。Wang 等^[55]制备的碳点, 内部存在平均尺寸为 2 nm 的空核。利用该碳点的这种结构特性, 将碳点与阿霉素(DOX)联合制作成载药系统, 碳

点与 DOX 以 π - π 堆积力、输水作用力、范德华力等非共价键的形式连接。研究表明, 该载药系统具有 pH 敏感特性。在 pH 7.4 的细胞外环境中比较稳定, 约有 4% 的 DOX 释放, 而在 pH 5.0 时药物释放量达 70%。观察发现, 该系统通过细胞内吞作用形成囊泡能够很快被细胞摄取。在溶酶体内酸性环境(pH 5.0)下 DOX 质子化, 从载体中释放进入细胞核, 发挥治疗作用(图 18)。空壳碳点载体本身对 A549 细胞的毒性较低, 并拥有良好的生物相容性。当浓度达到 400 $\mu\text{g/mL}$ 时, 也未发现对细胞的代谢产生明显抑制作用。而 HCD-DOX 供药系统的细胞毒性作用与单独使用 DOX 相当, 说明 CD-DOX 对 DOX 的药理作用并没有产生干扰。由于这种系统具有纳米结构和荧光特性, 并且碳点的发射光谱具有激发光依赖性, 可根据需要选择合适的发射荧光。因此可同时用于细胞标记和癌症的治疗。以中空碳点为基础的载药系统具有一系列的优点, 如能被细胞快速摄取、pH-控制药物释放、良好的生物相容性和激发光依赖性, 并且不影响药物的活性。这些优点为生物显影、生物标记、

图 18 DOX-HCDs 的制备及用于 A549 细胞的染色标记图。 (a) DOX-HCDs 的制备过程; (b-f) A549 与 DOX-HCDs 共孵 1.5 h 后荧光图。 (b) 染料染色后细胞核(蓝色); (c) DOX (红色); (d) 染料染色后细胞膜(绿色); (e) 微分干涉对比图像; (f) 叠加后的图像(白色箭头指示紫色区域为 DOX 与核染料 Hoechst 显色后叠加区域)^[55] (网络版彩图)

图 19 (a) 裸鼠静脉注射 C-Dots-Ce6 后不同时间点的实时近红外荧光成像图; (b) 24 h 后小鼠器官组织成像图(从上到下依次为: 心、肝、脾、肺、肾、肿瘤); (c) 静脉注射 C-Dots-Ce6 后, 肿瘤区域 24 h 内的平均荧光强度图; (d) 不同处理方法后 MGC803 肿瘤的生长曲线^[56] (网络版彩图)

生物医学等领域的应用提供了可能。

Huang 等^[56]用聚乙二醇二胺和 PEG2000N 修饰的碳点通过共价键连接上二氢卟吩 e6 (Ce6), 该碳点能通过荧光共振能量转移作用增强 Ce6 在长波上的荧光强度, 因此 C-Dots-Ce6 系统具有更强的组织穿透能力, 可更好地用于动物活体成像。并且 C-Dots-Ce6 能有效增强 Ce6 在光动力学上的治疗效果。通过静脉注射入接种 MGC803 皮下瘤的裸鼠体内, 观察其在裸鼠体内的实时近红外荧光分布。通过 671 nm 激光照射肿瘤部位 10 min, 观察 C-Dots-Ce6 系统的光动力治疗效果(图 19)。结果显示, 被照射的肿瘤部位出现局部收缩, 说明 C-Dots-Ce6 体系不但具有良好的成像效果, 而且对肿瘤也具有较强的治疗作用。该实验也说明了 C-Dots 与光敏剂及染料联合用于光动力学的治疗, 不但可以有效防止光敏剂和染料的聚集, 增加其在溶液中的稳定性, 提高其生物相容性; 而且 C-Dots 可以通过荧光共振能量转移作用间接激发光敏剂和染料, 延长体内的循环时间, 有效增加材料在肿瘤部位的吸收, 增强其对肿瘤的治疗作用。这种集显影标记和靶向治疗于一体的碳点体系, 由于具有良好的生物相容性, 在生物医学上将具有广泛的应用价值。

4 总结与展望

随着荧光碳点在生化分析、生物分子和细胞的染色、标记、检测等生物和医药领域应用的不断深入。人们对具有特殊性质荧光基团的需求也在增加, 同时碳点的合成方法以及与其功能相关性质的研究也在不断增加。我们认为, 为了制备具有多色荧光和高量子产率的碳点及拓宽它们的应用范围, 还须加大对发光机理的研究。对荧光碳点长期毒性的研究在内容和深度上也亟待加强和扩展。研究碳点与钝化试剂的相互作用和碳点修饰后的表面特征对于开发新型生物传感系统及构建高性能化学传感器具有重要意义。荧光碳点用于生物成像的工作才刚起步, 要想进一步开发其应用潜能, 仍有很多工作要做, 如怎样将碳点与更多生物活性分子偶联并赋予其靶向功能、如何用于癌症诊断和血管造影、如何为生物分析临床诊断提供新的方法。我们相信, 随着研究的深入, 这些问题将会迎刃而解。荧光碳点具有很多优于其他荧光纳米材料的优良性质, 作为新兴的纳米材料依旧具有值得期待的开发潜能, 相信随着不断研究和发展, 在不远的将来荧光碳点会对生物医药领域产生深远影响。

参考文献

- 1 Xu XY, Ray R, Gu YL, Ploehn HJ, Gearheart L, Raker K, Scrivens WA. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 12736–12737
- 2 Sun YP, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KA, Pathak P, Mezziani MJ, Harruff BA, Wang X, Wang HF, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen B, Veca LM, Xie SY. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 7756–7757
- 3 Lin F, He WN, Guo XQ. *Adv Mater*, 2011, 415–417: 1319–1322
- 4 Wang W, Cheng L, Liu WG. *Sci China Chem*, 2014, 57: 522–539
- 5 Fang YX, Guo S, Li D, Zhu C, Ren W, Dong SJ, Wang EK. *ACS Nano*, 2012, 6: 400–409
- 6 Liu R, Wu D, Liu S, Koynov K, Knoll W, Li Q. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 4598–4601
- 7 Bao L, Zhang ZL, Tian ZQ, Zhang L, Liu C, Lin Y, Qi B, Pang DW. *Adv Mater*, 2011, 23: 5801–5806
- 8 Wang X, Cao L, Yang ST, Lu F, Mezziani MJ, Tian L, Sun KW, Bloodgood MA, Sun YP. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 5310–5314
- 9 Welsher K, Liu Z, Sherlock SP, Robinson JT, Chen Z, Daranciang D, Dai H. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4: 773–780
- 10 Jeong J, Cho M, Lim YT, Song NW, Chung BH. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 5296–5299
- 11 Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M. *Nat Chem*, 2010, 2: 1015–1024
- 12 Wang L, Yue QL, Li HB, Xu SL, Guo LS, Zhang XX, Wang WJ, Liu JF, Liu P. *Sci China Chem*, 2012, 56: 86–92
- 13 Xiong BT, Wang CR, Luo JY, Chen BX, Zhou BX, Zhu ZY. *Sci China Chem*, 2012, 56: 101–105
- 14 Xue W, Lin Z, Chen H, Lu C, Lin JM. *J Physical Chem C*, 2011, 115: 21707–21714
- 15 Xiang DS, Zheng AH, Luo M, Ji XH, He ZK. *Sci China Chem*, 2012, 56: 380–386
- 16 Weng ZL, Xu Z, Gao C. *Sci China Chem*, 2014, 57: 605–614
- 17 Lam CW, James JT, McCluskey R, Arepalli S, Hunter RL. *Crit Rev Toxicol*, 2006, 36: 189–217
- 18 Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. *J Appl Toxicol*, 2009, 29: 69–78
- 19 Schwertfeger H, Fokin AA, Schreiner PR. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 1022–1036
- 20 Shen LM, Zhang LP, Chen ML, Chen XW, Wang JH. *Carbon*, 2013, 55: 343–349
- 21 Han WY, Chang YZ, Gao F. *Chemical Engineer*, 2011, 4: 18–22
- 22 Chandra S, Das P, Bag S, Laha D, Pramanik P. *Nanoscale*, 2011, 3: 1533–1540
- 23 Yang ST, Wang X, Wang HF, Lu FS, Peng J, Luo G, Cao L, Mohammed JZ, Liu JH, Liu YF, Chen M, Huang YP, Sun YP. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 18110–18114
- 24 Zhang LW, Yu WW, Colvin VL, Monteiro-Riviere NA. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 228: 200–211
- 25 Stern ST, Zolnik BS, McLeland CB, Clogston J, Zheng JW, McNeil SE. *Toxicol Sci*, 2008, 106: 140–152
- 26 Geys J, Nemmar A, Verbeken E, Smolders E, Ratoai M, Hoylaerts MF, Benoit N, Peter H. *Environ Health Perspect*, 2008, 116: 1607–1613
- 27 Qu SN, Wang XY, Lu QP, Liu XY, Wang LJ. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 12215–12218
- 28 Bazin G, Zhu JL. *Sci China Chem*, 2012, 56: 65–70
- 29 Miao XM, Feng ZZ, Tian J, Peng X. *Sci China Chem*, 2014, 57: 1026–1031
- 30 Wang W, Yuan XQ, Liu XH, Gao Q, Qi HL, Zhang CX. *Sci China Chem*, 2013, 56: 1009–1016
- 31 Du M, Kong QQ, Yang T, Jiao K. *Sci China Chem*, 2013, 56: 1325–1330
- 32 Tang YR, Su YY, Yang N, Zhang LC, Lv Y. *Anal Chem*, 2014, 86: 4528–4535
- 33 Shi W, Wang Q, Long Y, Cheng Z, Chen S, Zheng H, Huang Y. *Chem Commun*, 2011, 47: 6695–6697
- 34 Dai H, Yang CP, Tong YJ, Xu GF, Ma XL, Lin YY, Chen GN. *Chem Commun*, 2012, 48: 3055–3057
- 35 Bai WJ, Zheng HZ, Long YJ, Mao XJ, Gao M, Zhang LY. *Anal Sci*, 2011, 27: 243–246
- 36 Huang Q, Zhang H, Hu S, Li F, Weng W, Chen J. *Biosens Bioelectron*, 2014, 52: 277–280
- 37 Wei JF, Ren J, Liu J, Meng XW, Ren XL, Chen ZZ, Tang FQ. *Biosens Bioelectron*, 2014, 52: 304–309
- 38 Yang CL, Deng WP, Liu HY, Ge SG, Yan M. *Sensor Actuat B-Chem*, 2015, 216: 286–292
- 39 Du FK, Ming YH, Zeng F, Yu CM, Wu SZ. *Nanotechnology*, 2013, 24: 365101
- 40 Mehta VN, Jha S, Kailasa SK. *Mater Sci Eng C*, 2014, 38: 20–27
- 41 Weng CI, Chang HT, Lin CH, Shen YW, Unnikrishnan B, Li YJ, Huang CC. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68: 1–6
- 42 Wei JM, Zhang X, Sheng YZ, Shen JM, Huang P, Guo SK, Pan JQ, Feng BX. *Mater Lett*, 2014, 123: 107–111
- 43 Zhao SJ, Lan MH, Zhu XY, Xue HT, Ng TW, Meng XM, Lee CS, Wang PF, Zhang WJ. *ACS Appl Mater Interf*, 2015, 7: 17054–17060
- 44 Jiang K, Sun S, Zhang L, Lu Y, Wu AG, Cai CZ, Lin HW. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 127: 5450–5453
- 45 Tan M, Zhang L, Tang R, Song X, Li Y, Wu H, Wang H, Lv G, Liu W, Ma X. *Talanta*, 2013, 115: 950–956
- 46 Yang ST, Cao L, Luo PJ, Lu FS, Wang X, Wang HF, Mezziani MJ, Liu YF, Qi G, Sun YP. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 11308–11309

- 47 Hu LM, Sun Y, Li SL, Wang XL, Hu KL, Wang LR, Liang XJ, Wu Y. *Carbon*, 2014, 67: 508–513
- 48 Zheng M, Ruan SB, Liu S, T SunT, Qu D, Zhao HF, Xie ZG, Gao HL, Jing XB, Sun ZC. *ACS Nano*, 2015, 9: 11455–11461
- 49 Zhao WR, Chen HG, Li YS, Li L, Lang MD, Shi JL. *Adv Funct Mater*, 2008, 18: 2780–2788
- 50 Liu R, Mahurin SM, Li C, Unocic RR, Idrobo JC, Gao H, Pennycook SJ, Dai S. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 6799–6802
- 51 Thomas JJ, Pierre A, Schwartz E, Aleksa V, Jovanovic, Omar I, Jorge LC, Robert P, Randolph SD. *Langmuir*, 2006, 22: 8684–8689
- 52 Chao HS, Dong Z, Pauletti GM, Zhang J, Xu H, Gu H, Wang L, Ewing RC, Huth C, Wang F, Shi D. *ACS Nano*, 2010, 4: 5398–5404
- 53 Qian X, Peng XH, Ansari DO, Yin-Goen Q, Chen GZ, Shin DM, Yang L, Young AN, Wang MD, Nie S. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 83–90
- 54 Song EQ, Hu J, Wen CY, Tian ZQ, Yu X, Zhang ZL, Shi YB, Pang DW. *ACS Nano*, 2011, 5: 761–770
- 55 Wang QL, Huang XX, Long YJ, Wang XL, Zhang HJ, Zhu R, Liang LP, Teng P, Zheng HZ. *Carbon*, 2013, 59: 192–199
- 56 Huang P, Lin J, Wang XS, Wang Z, Zhang CL, He M, Wang K, Chen F, Li ZM, Shen GX, Cui DX, Chen XY. *Adv Mater*, 2012, 24: 5104–5110

The biological effects and environmental application of fluorescent carbon dots

Xuhu Hu^{1,2}, Xiangchun Zhang², Zhe Zhao³, Juanjuan Guo², Qiang Wang^{1*}, Ru Liu^{2*}

¹ College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

² CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety; Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Institute of Modern Hospital Management, Armed Police General Hospital, Beijing 100039, China

*Corresponding authors (email: wq@mail.scuec.edu.cn; liuru@ihep.ac.cn)

Abstract: As a new member of carbon nanomaterials, fluorescent carbon dots have excellent fluorescence properties and unique biological effect. They have attracted widespread attention since being found. After passivating modification, carbon dots were endowed relevant reactivity and targeted selectivity which diversified their applications. Because of the low toxicity and good biocompatibility, carbon dots have a broad application prospect in biomedical fields. This review described the application of carbon dots in biochemical analysis, microbiological testing, biological imaging, diagnosis and therapy.

Keywords: fluorescent carbon dots, biological effect, biochemical analysis, bioimaging, diagnosis and therapy

doi: 10.1360/N032015-00183